

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-272473

(43)Date of publication of application : 24.09.2002

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12Q 1/68

(21)Application number : 2001-083014

(71)Applicant : BUNSHI BIOPHOTONICS KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 22.03.2001

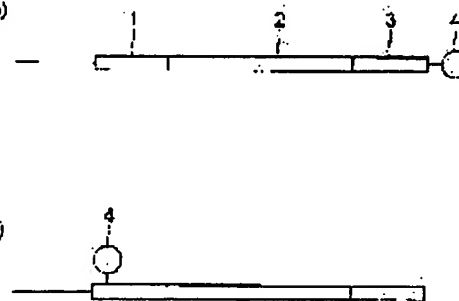
(72)Inventor : NAKANO YOSHITARO
ABE SATOSHI

(54) OLIGONUCLEOTIDE PROBE AND METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACID USING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an oligonucleotide probe that has a fluorescent dye and permits accurately discriminating differences among base sequences of target nucleic acids and simply detecting target nucleic acids in a wide temperature range, and to provide a method using the above oligonucleotide probe.

SOLUTION: An oligonucleotide probe having the first base sequence (a) region, the second base sequence region bound to one end of the first base sequence region and the third base sequence region bound to the other end of the second base sequence region, is provided, wherein a fluorescent dye is bound to the above first base sequence region or the third base sequence region, and the above first base sequence region and the third base sequence region have complementary sequences each other, and the above second base sequence region has a base sequence region complementary to the target nucleic acid. (b)



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-272473

(P 2 0 0 2 - 2 7 2 4 7 3 A)

(43) 公開日 平成14年9月24日 (2002. 9. 24)

| (51) Int. Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | ターコード ¹ | (参考) |
|----------------------------|------|------------|--------------------|---------|
| C12N 15/09 | ZNA | C12Q 1/68 | A | 4B024 |
| C12Q 1/68 | | C12N 15/00 | ZNA | A 4B063 |
| | | | F | |

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全8頁)

(21) 出願番号 特願2001-83014 (P 2001-83014)

(22) 出願日 平成13年3月22日 (2001. 3. 22)

(71) 出願人 595047385

株式会社分子バイオホトニクス研究所

静岡県浜北市平口5000番地

(72) 発明者 中野 義太郎

静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子

バイオホトニクス研究所内

(72) 発明者 阿部 聡

静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子

バイオホトニクス研究所内

(74) 代理人 100088155

弁理士 長谷川 芳樹 (外1名)

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA09 HA13

4B063 QA01 QA13 QQ42 QQ53 QR32

QR55 QR66 QR82 QS34 QX02

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチドプローブ及びそれを用いた核酸検出方法

(57) 【要約】

【課題】 蛍光色素を有するオリゴヌクレオチドプローブであって、標的核酸の塩基配列の差異を高精度に識別することを可能とするとともに標的核酸の広範囲の温度域において標的核酸を簡便に検出することを可能とするオリゴヌクレオチドプローブ及び前記オリゴヌクレオチドプローブを用いた核酸検出方法を提供すること。

【解決手段】 第1の塩基配列領域と、該第1の塩基配列領域の一端に結合した第2の塩基配列領域と、該第2の塩基配列領域の他端に結合した第3の塩基配列領域を有するオリゴヌクレオチドプローブであって、前記第1の塩基配列領域又は前記第3の塩基配列領域に蛍光色素が結合しており、前記第1及び第3の塩基配列領域は互いに相補的な配列を有し、かつ前記第2の塩基配列領域は標的核酸と相補的な塩基配列を有していることを特徴とするオリゴヌクレオチドプローブ。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 第1の塩基配列領域と、該第1の塩基配列領域の一端に結合した第2の塩基配列領域と、該第2の塩基配列領域の他端に結合した第3の塩基配列領域を有するオリゴヌクレオチドプローブであって、前記第1の塩基配列領域又は前記第3の塩基配列領域に蛍光色素が結合しており、前記第1及び第3の塩基配列領域は互いに相補的な配列を有し、かつ前記第2の塩基配列領域は標的核酸と相補的な塩基配列を有していることを特徴とするオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項2】 前記オリゴヌクレオチドプローブの一端が固相に結合していることを特徴とする請求項1に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項3】 請求項1または2に記載のオリゴヌクレオチドプローブと核酸溶液とを混合する第1の工程と、前記混合液に直線偏光を照射する第2の工程と、前記蛍光色素が発する蛍光の偏光状態を測定する第3の工程とを含むことを特徴とする核酸検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、標的核酸を検出するためのオリゴヌクレオチドプローブに関し、また、前記オリゴヌクレオチドプローブを用いた核酸検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】特定の塩基配列を有する核酸の検出方法は病原微生物の同定や遺伝子診断等の幅広い分野において利用されている。このような核酸（標的核酸）の検出には、検出しようとする塩基配列と相補的な塩基配列を有し、放射性同位体、酵素または蛍光色素等で標識されたオリゴヌクレオチドプローブを利用した方法が採られている。例えば、特開平2-75958号公報には蛍光標識された一本鎖のDNAプローブを分析検体中のDNAと接触させ、二本鎖形成前の蛍光の偏光状態と二本鎖形成後の蛍光の偏光状態との変位を測定することにより検体中のDNAにオリゴヌクレオチドプローブに対応する塩基配列が存在するか否かを検出する方法が記載されている。

【0003】しかしながら、前記DNAプローブを用いた場合に、蛍光色素の近傍がどのような塩基配列を有するかによって蛍光の偏光状態が異なる場合があり、標的となる核酸配列に依存して蛍光の偏光状態が変化し、ハイブリダイズ後の蛍光の偏光度を単純に測定しただけではその配列に相補的な塩基配列を有する核酸が存在したか否かを判別することが困難であった。そのため、ハイブリダイズ前の蛍光の偏光度をプローブの種類毎に予め測定しておき、ハイブリダイズ前後の値の差を計算して相補的な塩基配列を有する核酸が結合したか否かを判断する必要があるという問題があった。

【0004】また、近年のヒトゲノム解析やヒト塩基

多型(SNP: Single Nucleotide Polymorphism)解析の進展により、遺伝子診断においても被検体となる遺伝子の1から数塩基の差異を検出することが可能な高精度な核酸検出方法が望まれていた。

【0005】しかしながら、前記のような1から数塩基の差異を検出するには、検出したい塩基を含む領域をPCRで増幅した後シーケンサーによって塩基配列の決定をするという煩雑な方法をとる必要があり、これ以外の方法で確実に1から数塩基の差異を検出することは不可能であった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、蛍光色素を有するオリゴヌクレオチドプローブであって、標的核酸の塩基配列の差異を高精度に識別することを可能とするとともに標的核酸を簡便に検出することを可能とするオリゴヌクレオチドプローブ及び前記オリゴヌクレオチドプローブを用いた核酸検出方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、蛍光色素を有するオリゴヌクレオチドプローブであって、標的核酸非存在下では単独でループ構造をとり、かつ、標的核酸存在下では標的核酸と結合して直鎖構造をとるオリゴヌクレオチドプローブを利用することにより、前記オリゴヌクレオチドプローブと標的核酸の結合を前記オリゴヌクレオチドプローブに直線偏光を照射した際に発する蛍光の偏光状態から捉えることが可能となること、並びに、この方法により標的核酸の塩基配列の差異が広範囲の温度域において高精度に識別されることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち、本発明のオリゴヌクレオチドプローブは、第1の塩基配列領域と、該第1の塩基配列領域の一端に結合した第2の塩基配列領域と、該第2の塩基配列領域の他端に結合した第3の塩基配列領域を有するオリゴヌクレオチドプローブであって、前記第1の塩基配列領域又は前記第3の塩基配列領域に蛍光色素が結合しており、前記第1及び第3の塩基配列領域は互いに相補的な配列を有し、かつ前記第2の塩基配列領域は標的核酸と相補的な塩基配列を有していることを特徴とするオリゴヌクレオチドプローブである。

【0009】また、本発明のオリゴヌクレオチドプローブは、前記オリゴヌクレオチドプローブの一端が固相に結合していることを特徴とする前記のオリゴヌクレオチドプローブであることが好ましい。

【0010】また、本発明の核酸検出方法は、前記のオリゴヌクレオチドプローブと核酸溶液とを混合する第1の工程と、前記混合液に直線偏光を照射する第2の工程と、前記蛍光色素が発する蛍光の偏光状態を測定する第

3の工程とを含むことを特徴とする核酸検出方法である。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、場合により図面を参照しつつ本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

【0012】本発明のオリゴヌクレオチドプローブは、図1に示すように第1の塩基配列領域と、前記第1の塩基配列領域の一端に結合した第2の塩基配列領域と、前記第2の塩基配列領域の他端に結合した第3の塩基配列領域を有するオリゴヌクレオチドプローブであって、前記第1の塩基配列領域又は前記第3の塩基配列領域に蛍光色素が結合しており、前記第1及び第3の塩基配列領域は互いに相補的な配列を有し、かつ前記第2の塩基配列領域は標的核酸と相補的な塩基配列を有していることを特徴とするオリゴヌクレオチドプローブである。

【0013】次に、本発明にかかるオリゴヌクレオチドプローブの構造について説明する。図2(a)は本発明のオリゴヌクレオチドプローブの構成を示す模式図であり、図2(b)は前記オリゴヌクレオチドプローブと標的核酸が結合した場合の構造を示す模式図であり、図2(c)は標的核酸が存在しない場合の前記オリゴヌクレオチドプローブの構造を示す模式図である。

【0014】本発明のオリゴヌクレオチドプローブは、図2(a)に示すように第1の塩基配列領域と、前記第1の塩基配列領域の一端に結合した第2の塩基配列領域と、前記第2の塩基配列領域の他端に結合した第3の塩基配列領域を有するオリゴヌクレオチドプローブであり、前記第1及び第3の塩基配列領域は互いに相補的な塩基配列を有する。前記第1と第3の塩基配列領域が互いに相補的な塩基配列を有することにより、図2(c)に示すようにこれらの領域間で相補的な塩基同士が水素結合を形成し、その結果第1と第3の塩基配列領域が二本鎖構造を形成する。これによって前記第1と第3の塩基配列領域に挟まれた前記第2の塩基配列領域がループ構造をとる。なお、前記第1及び第3の塩基配列は互いに完全に相補的である必要はなく、二本鎖構造をとることが可能な塩基配列領域を含めばそれ以外の塩基配列領域の塩基配列は特に制限されない。また、前記第2の塩基配列領域に結合可能な標的核酸が存在する場合には図2(b)に示すように前記オリゴヌクレオチドプローブの第1及び第3の塩基配列領域が形成する相補的な結合が解離され、オリゴヌクレオチドプローブ及び標的核酸の複合体は直鎖構造をとる。

【0015】前記第1及び第3の塩基配列領域は互いに相補的な塩基配列を有していればその塩基数は特に制限されないが、好ましくは3～100塩基、より好ましくは5～10塩基である。塩基数が3塩基より少ないと前記第1及び第3の塩基配列領域が互いに相補的な結合をとりにくい傾向にあり、100塩基より多いとオリゴヌクレオチドの合成が困難になる傾向にある。

【0016】また、前記第2の塩基配列領域は標的核酸とハイブリダイズする領域であり、標的核酸と相補的な塩基配列の少なくとも一部の塩基配列を含むことが好ましい。しかしながら、標的核酸において塩基の付加、欠失及び変異等が存在する場合に、前記塩基の付加、欠失及び変異等の検出を行うために、前記第2の塩基配列領域中に1～10塩基程度の変異を有していてもよい。前記第2の塩基配列領域の塩基数は標的核酸の塩基数に応じて適宜決定されるが、好ましくは10～100塩基、より好ましくは15～50塩基である。塩基数が10塩基より少ないと標的核酸とのハイブリッド体を形成した際に安定性に欠ける傾向にあり、100塩基より多いとオリゴヌクレオチドの合成が困難になる傾向にある。

【0017】ここで、標的核酸とは、その一部に既知の塩基配列を含むものであればよく、既知の塩基配列の全てまたは一部の相補的な塩基配列を前記のオリゴヌクレオチドプローブの第2の塩基配列領域として用いる。また、前記標的核酸は、天然由来のDNAまたはRNAであってもよく、合成されたDNAまたはRNAであってもよい。

【0018】本発明のオリゴヌクレオチドプローブは前記第1の塩基配列領域又は前記第3の塩基配列領域に蛍光色素を有する。ここで用いられる蛍光色素としては、例えば、フルオロセイン系蛍光団、BODIPY系蛍光団、インドシアニン系蛍光団、ローダミン系蛍光団等が挙げられ、具体的には、例えば、4,4-ジフロロ-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-8-propionic acid)及びその誘導体(モレキュラプローブス社製:Bodipy 493/503シリーズ)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート(5-イソチオシアネートおよび6-イソチオシアネートの混合物であってもよい)(tetramethylrhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate)及びその誘導体(モレキュラプローブス社製:TRITCシリーズ)、及び4,4-ジフロロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionic acid)及びその誘導体(モレキュラプローブス社製:Bodipy FLシリーズ)、1,1'-ビス(ε-カルボキシペンチル)-3,3,3',3'-テトラメチルインドジカルボシアニン-5,5'-ニスルホン酸カリウム塩(1,1'-bis(ε-carboxypentyl)-3,3,3',3'-tetramethyl indodicarbocyanine-5,5'-disulfonate potassium salt)及びその誘導体(アマシャムファルマシアバイオテク社製:Cy5シリーズ)、1,1'-ビス(ε-カルボキシペンチル)-3,3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニン-5,5'-ニスルホン酸カリウム塩(1,1'-bis(ε-carboxypentyl)-3,3,3',3'-tetramethyl indocarbocyanine-5,5'-disulfonate potassium salt)

り及びその誘導体（アマシヤム ファルマシアバイオテ
ク社製：Cy3シリーズ）、X-ローダミンイソチオシ
アネート（5-イソチオシアネート及び6-イソチオシ
アネートの混合物であってもよい）（X-rhodamine-5-(a
nd-6)-isothiocyanate）及びその誘導体（モレキュラー
プローブ社製：XRITCシリーズ）、6-

((4, 4-ジフロロ-5-(2-チエニル)-4-
ボラ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン-3-イ
ル) スチロキシ) アセチル) アミノヘキサン酸 (6-
(((4, 4-difluoro-5-(2-thienyl)-4-bora-3a, 4a-diaza-s
-indacene-3-yl)styryloxy)acetyl)amino)hexanoic aci
d) 及びその誘導体（モレキュラープローブ社製：Bod
ipy 630/650シリーズ）、6-((4, 4-ジフロ
ロ-5-(2-ピローリル)-4-ボラ-3a, 4a-ジ
アザ-s-インダセン-3-イル) スチロキシ) アセ
チル) アミノヘキサン酸 (6-(((4, 4-difluoro-5-(2-pyr
rolyl)-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-yl)styryl
oxy)acetyl)amino)hexanoic acid) 及びその誘導体（モ
レキュラープローブ社：Bodipy 650/665シリーズ）等
が挙げられ、中でもFITC、BODIPY-FL、Cy-3、Rhodamine
6G、TRITC、XRITC、FluorX、Rhodamine Green、Rhodol
Green、Oregon Greenが好適に用いられる。

【0019】上記オリゴヌクレオチドと上記蛍光色素と
の結合様式は、用いられる蛍光色素の結合基によって適
宜選択することができるが、例えば、オリゴヌクレオチ
ド側の水酸基またはその誘導体と結合できる結合基を介
して結合される。例えば、前記蛍光色素のカルボン酸基
と水酸基によって生じるエステル結合、イソシアネート
基と前記水酸基によって生じるチオカルバメート結合、
イソシアネート基とアミノ基で修飾されたオリゴヌクレ
オチドによって生じるチオ尿素結合、スクシミジルエス
テルとアミノ基で修飾されたオリゴヌクレオチドによっ
て生じるカルボキシアミド結合、スルフォニルクロライ
ドとアミノ基で修飾されたオリゴヌクレオチドによって
生じるスルフォンアミド結合が挙げられる。

【0020】また、本発明のオリゴヌクレオチドプロ
ーブは、上記オリゴヌクレオチドと上記蛍光色素の間にリン
カーを介していてもよい。前記リンカーとして、例え
ば、メチレン鎖、オリゴヌクレオチド、オリゴペプチ
ド、オリゴ等が挙げられ、好ましくはメチレン鎖または
オリゴヌクレオチドが挙げられる。前記リンカーの長さ
はメチレン鎖の場合、メチレン鎖を構成するメチレン基
($-(CH_2)_m-$) の数 (m) が2~12であることが好
ましく、3~6であることがより好ましい。また、オリ
ゴヌクレオチドの場合、塩基数が1~30塩基であるこ
とが好ましく、1~10塩基であることがより好まし
い。

【0021】また、前記オリゴヌクレオチドプロ
ーブにおいて、その一端が固相に結合し固定されている状態
で用いることが好ましい。前記オリゴヌクレオチドプロ

ーブを固相に固定することにより、直線偏光の照射によ
ってオリゴヌクレオチドプローブが有する蛍光色素の運動
範囲が空間的に限定され、その結果、前記蛍光色素がほ
ぼ同じ場所で励起と発光を繰り返すことになり、標的核
酸をより高感度に検出することが可能となる。さらに、
前記オリゴヌクレオチドプローブの第2の塩基配列領域
がそれぞれ異なった複数のオリゴヌクレオチドプローブ
を1つの固相に固定することにより、一度の核酸検出反
応で複数の標的核酸の検出が可能となる。この場合、用
いられる固相として、例えば、ガラス、金属及び高分子
物質が挙げられ、性状としては、板状、膜状及び粒状が
挙げられる。中でも、板状のガラス（例えばスライドガ
ラス）であることが好ましい。

【0022】さらに、本発明のオリゴヌクレオチドプロ
ーブは、上記の固相上に前記オリゴヌクレオチドプロ
ーブがアレイ状に配列した、いわゆるDNAチップであるこ
とが好ましい。この場合、各々のオリゴヌクレオチドは
前記固相の表層に固定されるが、その固定様式は前記固
相表面上の活性基に基づいて決定されればよく、例え
ば、共有結合、イオン結合、抗原-抗体相互作用及びア
ビジン-ビオチン相互作用等が挙げられる。具体的
には、例えば、アミノ基修飾したオリゴヌクレオチドをアル
デヒドコートしたガラスに結合させることが可能である。

【0023】上述したような、本発明のオリゴヌクレ
オチドプローブを用いることにより、前記オリゴヌクレ
オチドプローブが標的核酸と結合すると、前記オリゴヌ
クレオチドプローブが有する蛍光色素が発する蛍光の偏
光度が減少することが本発明者らによって見出されてお
り、前記オリゴヌクレオチドプローブに直線偏光を照射
した際に発する蛍光の偏光度から標的核酸の塩基配列の
差異を高精度に識別することが可能となるとともに標的
核酸を簡便に検出することが可能となる。

【0024】また、本発明のオリゴヌクレオチドプロ
ーブは、蛍光標識された部位の近傍に存在する塩基配列、
すなわち前記第1及び第3の塩基配列領域の塩基配列の
種類及びこれらの領域が一本鎖であるか二本鎖であるか
の形態の違いに基づいてのみ蛍光の偏光度の変化を示
し、前記第2の塩基配列領域の塩基配列の違いによっ
ては影響を受けない。一方、前記第2の塩基配列領域は、
標的核酸が存在するときのみ二本鎖を形成し、その結
果、前記第1及び第3の塩基配列領域の一本鎖化が生じ
るが、標的配列と数塩基異なる塩基配列を有する塩基と
は二本鎖を形成しないため、この場合は第1及び第3の
塩基配列領域は二本鎖のまま維持される。従って、前記
第1及び第3の塩基配列領域の塩基配列を適切に設定す
ることにより（常に同一の配列にしてもよいし、同じ蛍
光の偏光状態を示すように設計された異なる配列を組合
わせて使用してもよい）、前記第2の塩基配列領域の塩
基配列の違いにかかわらず、標的配列の有無を蛍光の偏

光度として観察することが可能となる。

【0025】次に、本発明のオリゴヌクレオチドプローブを用いて、標的核酸の検出を行う方法について説明する。

【0026】本発明の核酸検出方法は、上記のオリゴヌクレオチドプローブと核酸溶液とを混合させる第1の工程と、前記混合液に直線偏光を照射する第2の工程と、前記蛍光色素から発する蛍光の偏光状態を測定する第3の工程とを含むことを特徴とする核酸検出方法である。

【0027】本発明の第1の工程は、上記のオリゴヌクレオチドプローブと核酸溶液とを混合させる工程である。

【0028】ここで用いられるオリゴヌクレオチドプローブは、上述したオリゴヌクレオチドプローブである。また、ここで用いられる核酸溶液は、上記の標的核酸を含むと考えられる溶液である。さらに、前記の核酸溶液において、核酸が溶解している溶媒は特に限定されないが、通常の核酸のハイブリダイズに用いられる緩衝液であることが好ましく、具体的には、例えば、SSPE緩衝液、SSC緩衝液が挙げられる。また、前記緩衝液には必要に応じて、例えば、ホルムアミド、SDSを添加してもよい。

【0029】前記オリゴヌクレオチドプローブと前記核酸溶液を混合する条件は核酸のハイブリダイズに通常用いられる条件であればよく、具体的には、例えば、前記の緩衝液に前記オリゴヌクレオチドプローブと前記核酸溶液を懸濁し、好ましくは20～60℃、より好ましくは25～37℃でインキュベートすればよい。ここでインキュベートの時間は適宜設定すればよいが、好ましくは1分～24時間、より好ましくは5～30分である。

【0030】本発明の第2の工程は、前記混合液に前記オリゴヌクレオチドプローブが有する蛍光色素に直線偏光を照射する工程である。

【0031】前記混合液に含まれるオリゴヌクレオチドプローブが有する蛍光色素に直線偏光を照射する光源としては、例えば、超高圧水銀灯、アルゴンレーザー、YAGレーザー及びモード同期チタンサファイアレーザーが挙げられる。

【0032】本発明の第3の工程は、前記蛍光色素から発する蛍光の偏光状態を検出する工程である。

【0033】前記の蛍光の偏光状態を検出する検出器としては、例えば、2次元検出器（具体的には、イメージインテンシファイア付きCCDカメラ）及びポイント検出器（具体的には光電子増倍管）が挙げられる。

【0034】上述のように、前記の励起光源から直線偏光を照射されたオリゴヌクレオチドプローブは、標的核酸と結合し、ハイブリッド体を形成すると、標的核酸が結合していない時と比較して蛍光の偏光度が小さくなるため標的核酸が結合したものと判断できる。

【0035】ここで、前記の蛍光の偏光度は以下のよう

にして計算される。すなわち、励起をダイクロイックミラーに対してp偏光方位及びs偏光方位で行い、p偏光励起に対して平行な偏光成分（p偏光成分）と垂直な偏光成分（s偏光成分）の蛍光強度 I_{pp} と I_{ps} 及びs偏光励起に対して平行な偏光成分（s偏光成分）と垂直な偏光成分（p偏光成分）の蛍光強度 I_{ss} と I_{sp} を取得し、得られた4個の蛍光強度から偏光応答補正因子Gと蛍光偏光度p又は蛍光異方性比rを次式により計算した。

$$p = (I_{pp} \cdot G \cdot I_{ps}) / (I_{pp} + G \cdot I_{ps})$$

$$r = (I_{pp} \cdot G \cdot I_{ps}) / (I_{pp} + 2G \cdot I_{ps})$$

$$G = [(I_{pp} \cdot I_{sp}) / (I_{ps} \cdot I_{ss})]^{1/2}$$

すなわち、このG因子による偏光応答補正を行うことにより、蛍光偏光度p及び蛍光異方性比rを高精度に求めることができる。

【0036】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0037】実施例1～3

オリゴヌクレオチドの5'末端にビオチンを導入し、3'末端にアミノ基を導入したオリゴヌクレオチドプローブをホスホロアミダイト固相合成法により合成し、FITC（I型：同仁化学社製）と反応させることで以下の2種のプローブを得た。

プローブA：5'-(ビオチン)-GCGAGAAGTTAAGACCTATGCTCGC-(FITC)-3'（配列番号1）

上記のオリゴヌクレオチドプローブの合成において、5'末端へのビオチンの導入にはBiotin-amidite（Perkin Elmer社製）を用い、3'末端へのアミノ基の導入には3'-Amin-ON CPG（PERSEPTIVE社製）をそれぞれ用いた。

【0038】合成したオリゴヌクレオチドプローブはそれぞれイオン交換高速液体クロマトグラフィー法にて純度99%以上になるように精製し、凍結乾燥した後、最終濃度が25μMになるようにTE緩衝液（1mMのエチレンジアミン四酢酸を含む10mMトリス塩酸緩衝液（pH8.0））に溶解し、オリゴヌクレオチドプローブ原液として以下の実験に使用した。

【0039】上記のオリゴヌクレオチドプローブ原液を0.3×SSPE（45mM 塩化ナトリウムと0.3mM エチレンジアミン四酢酸を含む3mM リン酸緩衝液（pH8.0））に最終濃度25nMになるように希釈してプローブ液とし、このプローブ液200μlを25、31、37℃でそれぞれ10分間インキュベートした後、BEACON2000（宝酒造社製）を用いて各温度におけるプローブ単独の偏光度を測定した。

【0040】次に、プローブAの一部と相補的な塩基配

列を有する標的核酸C及び標的核酸Cと一塩基だけ配列が異なる標的核酸Dを上記と同様の方法で合成及び精製し、オリゴヌクレオチドプローブ原液を準備した。

標的核酸C : 5'-CATAGGTCTTAAGTT-3' (配列番号3)

標的核酸D : 5'-CATAGGTGTTAAGTT-3' (配列番号4)

前記の標的核酸C及び標的核酸Dを最終濃度125nMになるように希釈してプローブ液とし、プローブAと混合して蛍光の偏光度の測定を行った。

【0041】

【表1】

| 実施例 | 温度(°C) | 偏光度($\times 10^{-3}$) | | |
|------|--------|-------------------------|-----------------|-----------------|
| | | プローブA | プローブA+ 標的核酸C | プローブA+ 標的核酸D |
| 実施例1 | 25 | 73.4 | 69.8 | 48.3 |
| 実施例2 | 31 | 59.7 | 59.2 | 41.6 |
| 実施例3 | 37 | 49 | 48.6 | 36.3 |

【0042】その結果、プローブAは標的核酸Dと共存したときのみ特異的に低い偏光度を示し、標的核酸Cと共存したときにはプローブA単独時とほぼ同じ偏光度であることが確認された。従って、プローブAを用いることにより、標的核酸Cと標的核酸Dの1塩基配列の差異を識別することができた。

【0043】比較例1～3

| 比較例 | 温度(°C) | 偏光度($\times 10^{-3}$) | | |
|------|--------|-------------------------|-----------------|-----------------|
| | | プローブB | プローブB+ 標的核酸C | プローブB+ 標的核酸D |
| 比較例1 | 25 | 48.9 | 109.8 | 119 |
| 比較例2 | 31 | 39.8 | 83.9 | 104.1 |
| 比較例3 | 37 | 32.1 | 39.4 | 87.3 |

【0045】プローブBは標的核酸CまたはDと共存したときのいずれについても、プローブB単独時より明らかに高い偏光度を示した。従って、標的核酸Cと標的核酸Dのいずれを用いたかを識別することは困難であった。

【0046】実施例4

スライドガラス (Greiner社製)の表面をシリレート修飾し、粘着テープを用いて9mm×9mmの領域を囲った。この領域に100μg/mlとなるように1×SSPE (150mM塩化ナトリウムと1mMエチレンジアミン四酢酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH8.0))に希釈したストレプトアビジン (和光純薬社製)を150μl添加し、室温で2時間振盪した。この溶液を最終濃度が1μMになるように希釈したプローブE溶液100μlと置換し、室温で10分間振盪した後、さらに1×SSPEと置換した。プローブEの配列を以下に示す。

プローブE : 5' (biotin)-AAGCGAGAAGTTAAGACCTATGCTCGC-(FITC)3' (配列番号5)

上記の反応が終了したスライドガラス上の領域内を直線偏光励起し、励起光と平行な偏光成分と垂直な偏光成分の画像をそれぞれ取得し、得られた蛍光画像から蛍光の偏光度を求めた。

【0047】次に、プローブEと完全に塩基配列が一致している標的核酸C又はプローブEと一つのみスマッチ塩基を有する標的核酸DをプローブEと混合し、蛍光の偏光度の測定を行った。標的核酸C及び標的核酸Dの塩

基配列を以下に示す。
プローブAに代えてプローブB : 5'-(ビオチン)-AAAAAAGTTAAGACCTATG-(FITC)-3' (配列番号2)を用いた以外は実施例1～3と同様にして、蛍光の偏光度を測定した。

【0044】

【表2】

基配列を以下に示す。

標的核酸C : 3'-TTCAATTCTGGATAC-5' (配列番号6)

標的核酸D : 3'-TTCAATTGTGGATAC-5' (配列番号7)

蛍光画像の取得には励起光として100Wの高圧水銀ランプを使用し、この励起光を偏光子を通して倒立型顕微鏡 (TE300 : ニコン社製)に導入し、開口数0.5倍の蛍光観察用対物レンズ (Nikon Plan Fluor : ニコン社製)を用いて落射照明した。

【0048】蛍光の観察には透過波長が465～495nmの励起フィルター、505nmにカットオフ波長を有するダイクロイックミラー、20倍の蛍光観察用対物レンズ及び透過波長域が515～540nmのバンドパスフィルターを用いて直行する2偏光成分に分離し、ダブルビュー光学系 (浜松ホトニクス社製)を用いて1台のイメージインテンシファイア付きCCD上に画像が隣り合うように調製して同時に受光した。励起は、ダイクロイックミラーに対してp偏光方位及びs偏光方位で行い、p偏光励起に対して平行な偏光成分 (p偏光成分)と垂直な偏光成分 (s偏光成分)の蛍光強度IppとIps及びs偏光励起に対して平行な偏光成分 (s偏光成分)と垂直な偏光成分 (p偏光成分)の蛍光強度IssとIspを取得した。得られた4個の蛍光強度から偏光応答補正因子G、偏光度pを算出した。得られた結果を表3に示す。

【0049】

【表3】

| 標的核酸 | 実験番号 | 偏光度($\times 10^{-3}$) | | |
|-------|------|-------------------------|----------------|------------|
| | | プローブE | プローブE+ 標的核酸 | 標的核酸 のみ |
| 標的核酸C | 1 | 129 | 100 | -29 |
| | 2 | 127 | 105 | -22 |
| | 3 | 128 | 102 | -26 |
| 標的核酸D | 1 | 139 | 147 | 8 |
| | 2 | 140 | 149 | 9 |
| | 3 | 140 | 148 | 8 |

【0050】表3より、プローブと標的配列の塩基配列が完全一致する場合は偏光度が顕著に下がっている。

【0051】

【発明の効果】以上説明したように、本発明のオリゴヌクレオチドプローブ及び前記オリゴヌクレオチドプローブを用いた核酸検出方法によれば、標的核酸の塩基配列

の差異を高精度に識別することが可能となるとともに標的核酸の広範囲の温度域において標的核酸を簡便に検出することが可能となる。

【0052】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Laboratory of Molecular Biophotonics
 <120> Oligonucleotideprobe and method of detection for nucleic acid
 <130> MBP-165
 <140>
 <141>
 <160> 5
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic oligo
 nucleotide
 This probe is labeled with biotin and FITC.
 <400> 1
 gcgagaagtt aagacctatg ctgc
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic oligo
 nucleotide
 <400> 2
 aaaaaaagtt aagacctatg
 <210> 3
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic oligo
 nucleotide
 <400> 3
 cataggtctt aactt

25

20

15

13

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic oligo
nucleotide

<400> 4

catagtggtt aactt

15

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

This probe is labeled with biotin and FITC.

<400> 5

aagcgagaag ttaagaccta tgctcgc

27

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明のオリゴヌクレオチドプローブを示す模式図である。

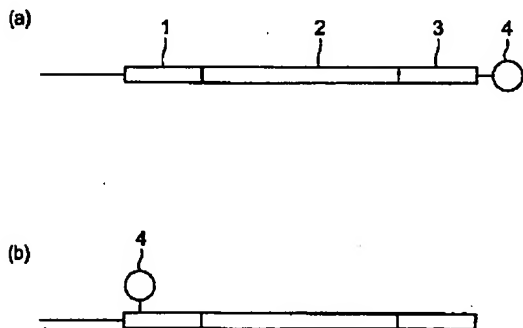
【図 2】(a) は本発明のオリゴヌクレオチドプローブを示す模式図である。(b) は本発明のオリゴヌクレオチドプローブが標的核酸と結合した状態を示す模式図で

20 ある。(c) は標的核酸が存在しない場合の本発明のオリゴヌクレオチドプローブの状態を示す模式図である。

【符号の説明】

1…第 1 の塩基配列領域、2…第 2 の塩基配列領域、3…第 3 の塩基配列領域、4…蛍光色素、5…標的核酸

【図 1】



【図 2】

